

ЗМІНИ У ФОТОСИНТЕТИЧНОМУ АПАРАТІ БОБОВИХ КУЛЬТУР, УРАЖЕНИХ ЗБУДНИКАМИ БАКТЕРІОЗІВ ТА ФІТОПЛАЗМОЗІВ

Гуляєва Г.Б., Токовенко І.П., Пасічник Л.А., Щербина Т.М.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: ab_k@ukr.net*

Мета. Дослідження динаміки змін у фотосинтетичному апараті листків за впливу штучного зараження рослин бобових культур *Galega orientalis L.* і *Medicago L.* фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп: збудником бактеріозу – *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* Д13 і збудником фітоплазмозу – *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. **Методи.** Культивування бактерій і мікоплазм, приготування бактеріальної і мікоплазмової суспензії виконували за загальноприйнятими методиками, штучну інокуляцію рослин отриманими суспензіями здійснювали методом субепідермальної ін'єкції. Фотохімічну активність листків визначали методом індукції флуоресценції хлорофілу, а спектрометрією – концентрацію фотосинтетичних пігментів. Для статистичної обробки використовували програми MS Excel. **Результати.** Узагальнено дані стосовно впливу фітопатогенних мікроорганізмів різних таксономічних груп: *A. laidlawii* var. *granulum* 118 й *P. syringae* pv. *atropaciens* Д13 на стан і активність фотосинтетичного апарату рослин *Galega orientalis L.* і *Medicago L.* Встановлено, що ще до появи візуальних проявів інфікування – на 4 добу від початку – відбувається пригнічення ефективності світлової фази фотосинтезу завдяки скороченню пулу акцепторів електронів у електрон-транспортному ланцюгу ФС II фотосинтетичного апарату листків рослини-хазяїна, яке через 14 діб призводить до суттєвих фотофізичних змін і пригнічення ефективності фотосинтезу у листках. Виявлені фотофізичні зміни віддзеркалювали скорочення вмісту хлорофілу а у всіх варіантах ураження. **Висновки.** Штучне інфікування рослин бобових культур фітопатогенами різних таксономічних груп призводить до зниження ефективності акумулявання енергії квантів світла фотосинтетичним апаратом листків, що на ранніх стадіях відбувається внаслідок скорочення пулу акцепторів електронів. На більш пізніх стадіях патологічний процес поглиблюється, що погіршує фотосинтетичну активність листків. Виявлено більшу чутливість бобових рослин до змішаної і бактеріальної інфекції та порівняно вищу чутливість рослин козлятника 1-го року вирощування до досліджуваних фітопатогенів.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum*, *Medicago L.*, *Galega orientalis L.*, фотосинтетичний апарат, індукція флуоресценції хлорофілу, хлорофіл а і b, каротиноїди.

Збереження і збагачення земельних ресурсів і використання для цього екологічно-ощадливих технологій є одним із найактуальніших питань, що стоять перед сільським господарством сьогодні. Важливими компонентами таких технологій є науково-обґрунтовані сівозміни із оптимальним підбором культурних рослин, а також застосування сидеральних культур як попередників до основних. Кращими сільськогосподарськими культурами за для цієї мети є бобові, важливою здатністю яких є симбіотична

фіксація азоту з атмосфери завдяки функціонуванню бобово-ризобіально-го симбіозу із бульбочковими бактеріями [1]. Окрім цього, бобові можуть виступати як сидеральні рослини, збагачуючи ґрунт значною кількістю органічних речовин, покращуючи його структуру, родючість і аерацію, виконуючи протиерозійну роль. Завдяки високому вмісту білка, поживних речовин, амінокислот вони є гарними кормовими культурами для тваринництва [2–4]. Таким чином, бобові рослини відіграють важливу роль у відновленні родючості ґрунту, в тому числі люцерна і козлятник, що є гарними попередниками для інших культур, особливо злакових. Разом із тим ці культури можуть потерпати від ураження фітопатогенними мікроорганізмами, що не тільки погіршує їх здатність фіксувати атмосферний азот й насичувати ним ґрунт та давати урожай біомаси низької якості, але й самі нерідко стають джерелом інфекції для інших культур у сівозміні. Таким чином, патогенні мікроорганізми, що зберігаються у ґрунті на рештках рослинної речовини, можуть уражувати як основну рослину-хазяїна, так і інші культури, об'єднані однією сівозміною.

За даними моніторингу серед фітопатогенних мікроорганізмів значне місце посідають фітопатогенні бактерії, зокрема, завдяки широкому спектру екологічних ніш виживання [5–8]. Збудник базального бактеріозу пшениці – *P. syringae* pv. *atropaciens* є широко розповсюдженим (ураження може поширюватись на 30–80% угідь). Має характерні симптоми плямистостей різних частин вегетуючих рослин, зокрема, на лусочках, зерні, стеблах, листках, кореневій шийці та ін. При найбільш негативному впливу за сильного ураження цією хворобою суттєво погіршуються фізико-технологічні й біохімічні якості зерна. Цей патоген здатен уражувати пшеницю в природних умовах, а за штучної інокуляції – жито, ячмінь, овес та багато інших культур, у тому числі із родини бобових [6, 7].

Серед мікроорганізмів із високою шкодочинністю слід враховувати також фітопатогенні мікоплазми, що відносяться до класу молікют. Ураження цими фітопатогенами важко контролювати й діагностувати на ранніх етапах розвитку, оскільки яскраво виражених ознак фітоплазмоз може набувати лише з часом. Ускладнює діагностику й поліморфізм симптомів, що можуть виникати відразу або з часом на одній рослині: пригнічення росту, зів'янення, хлороз, антоціаноз, деформація органів тощо [9]. Окрім того, шкодочинність підсилюється ще й тим, що один вид молікюту може бути здатним до ураження декількох видів рослин, маючи широку філогенетичну спеціалізацію [9]. Тому це питання потребує більш детального дослідження. До найбільш поширених шкодочинних фітопатогенних представників цього класу належить *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118, яка викликає блідо-зелену карликовість пшениці. Попередніми дослідженнями встановлено, що за ураження фітопатогенною ахолеплазмою змінюється метаболізм рослини-хазяїна, що призводить до надмірного накопичення крохмалю й руйнування хлоропластів та зменшення кількості хлорофілу. Встановлено надмірне накопичення позаклітинної фруктозо-1,6-бісфосфатази в листках, що порушує механізм субстрат-ферментного регулювання [10]. У зв'язку із вищесказаним можна передбачити, що культурні рослини, пов'язані однією сівозміною, такі як пшениця і люцерна або козлятник, потенційно можуть уражатись одними й тими ж мікроорганізмами.

Варто відмітити, що суттєвою ланкою продукційного процесу рослини як авторегуляторної донорно-акцепторної системи є фотосинтетична асиміляція вуглецю, завдяки якій накопичується біомаса й формується урожайність культурних рослин [11]. У зв'язку із цим набуває актуальності діагностика ранніх змін в активності фотосинтетичного апарату рослин, зокрема бобових, що відображує особливості їх продукційного процесу в умовах ураження збудниками фітоплазмової і бактеріальної інфекції. Тому **метою** нашої роботи було дослідження динаміки змін у фотосинтетичному апараті листків за впливу штучного ураження рослин бобових культур *Galega orientalis L.* і *Medicago L.* фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп: збудником бактеріозу – *P. syringae* pv. *atropaciens* Д13 і збудником фітоплазмозу – *A. laidlawii* var. *granulum* 118.

Матеріали і методи. У польових дослідах вирощували рослини *Galega orientalis L.* і *Medicago L.* на дослідних ділянках ІМВ ім. Д.К. Заболотного, загальною площею 70 м². Штучне зараження рослин фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп проводили модифікованим методом Клемента (субепідермальна ін'єкція) у фазу двох справжніх листків у межах однієї доби [12].

Бактеріальна культура *P. syringae* pv. *atropaciens* Д13 була ізольована з буро-коричневих плям-штрихів на обгортковому листі пшениці (зразки уражених рослин отримані з Дніпропетровської області). Отриманий штамп вірулентний для пшениці, агресивність – 4 бали за 4-х бальною шкалою. Культивування бактерій та приготування бактеріальної суспензії виконували за загальноприйнятими методиками [12]. Щільність бактеріальної суспензії – 1×10^9 КУО/мл.

Фітопатогенну мікоплазму *A. laidlawii* var. *granulum* 118 (УКМ ВМ-34) культивували на рідкому поживному середовищі СМ ІМВ-72 (рН=7.8) у термостаті за температури 32°C впродовж 72 год [13].

Інфікування проводили за наступною схемою: 1 – контроль (неінфіковані рослини); 2 – рослини, штучно інфіковані *A. laidlawii* var. *granulum* 118; 3 – рослини, штучно інфіковані *P. syringae* pv. *atropaciens*; 4 – рослини, штучно інфіковані *A. laidlawii* var. *granulum* 118 та *P. syringae* pv. *atropaciens* (змішана інфекція).

Дослідження змін функціонального стану і активності фотосинтетичного апарату здорових й уражених рослин виконували, застосовуючи біофізичний метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), фіксуючи дані портативним приладом вітчизняного виробництва «Флоратест». Прилад оснащений рідиннокристалічним дисплеєм (128*64 пікселів) і виносним оптоелектронним сенсором із довжиною хвилі опромінення 470 ± 15 нм, площею плями опромінення не менше 15 мм² і освітленості в її межах не менше 2,4 Вт/м². Спектральний діапазон вимірювань інтенсивності флуоресценції – в межах від 670 до 800 нм. Програмне забезпечення «Флоратест», що йде у комплекті із приладом, виконує прийняття вимірних приладом даних через USB-порт комп'ютера та здійснює відображення цих даних у табличному або графічному вигляді [14, 15].

Серію 10-секундних і 4-хвилинних вимірювань ІФХ проводили через 4, 8 і 14 діб після інфікування патогенами на листках верхніх ярусів. Повторність вимірювань на кожному варіанті – п'ятикратна. Темнову

адаптацію листків перед вимірюваннями (не менше 20 хв) створювали, закріплюючи на листку чохол із цупкого паперу. Отриманий масив цифрових даних обчислювали у кожному варіанті і представляли у графічному вигляді – так званих кривих Каутського. Типова крива Каутського представлена на рис. 1.

На цій кривій знаходили відповідні індукційні точки, що відображують вплив досліджуваних чинників на функціональні ланки ФС II (табл. 1).

За визначеними точками розраховували відповідні критичні параметри ІФХ, що є відображенням змін у функціональних ланках фотосинтетичного апарату [15–21].

Критичні параметри, що аналізувалися: фонові флуоресценція (F_0); F_m – показник «максимуму флуоресценції»; варіабельна флуоресценція – F_v , що розраховували як $F_v = F_m - F_0$; максимальна квантова ефективність ФС II, яку розраховували як F_v/F_m ; коефіцієнт K_{pl} – кількість Q_B -невідновлювальних комплексів, що не приймають участь у лінійному транспорті електронів $K_{pl} = (F_{pl} - F_0) / (F_m - F_0)$; $1/2t$ – показник половини часу, необхідного для досягнення варіабельної флуоресценції; коефіцієнт K_i , що корелює із інтенсивністю рибулозобісфосфаткарбоксілази/оксигенази (Рубіско) або ланкою темної фіксації вуглецю ($K_i = (F_m - F_t)/F_m$) [15, 16, 18–23].

Стабільність світлозбиральних комплексів ФС II (СЗК II) до впливу інфікування збудниками визначали за відносними змінами F_0 , використовуючи співвідношення (F_0 (8 діб)/ F_0 (14 діб)). Зазвичай цей параметр використовують для оцінки стану фотосинтетичного апарату за високотемпературного стресу, де змінною величиною слугує показник F_0 за різної величини стресових температур [24]. Визначення стійкості фотосинтетичного апарату до впливу досліджуваних збудників розраховували за змінами квантового виходу фотохімічного перетворення енергії F_v , використовуючи співвідношення (F_v (8 діб)/ F_v (14 діб)).

Пігментний склад (хлорофіл *a*, хлорофіл *b* і каротиноїди) у листках визначали через 14 діб після інфікування методом екстракції у ДМСО, за яким наважки свіжозрізаного рослинного матеріалу листків заливали ДМСО й прогрівали у сушильній шафі до повного обезбарвлення листових пластинок. Оптичну густина отриманих екстрактів визначали на

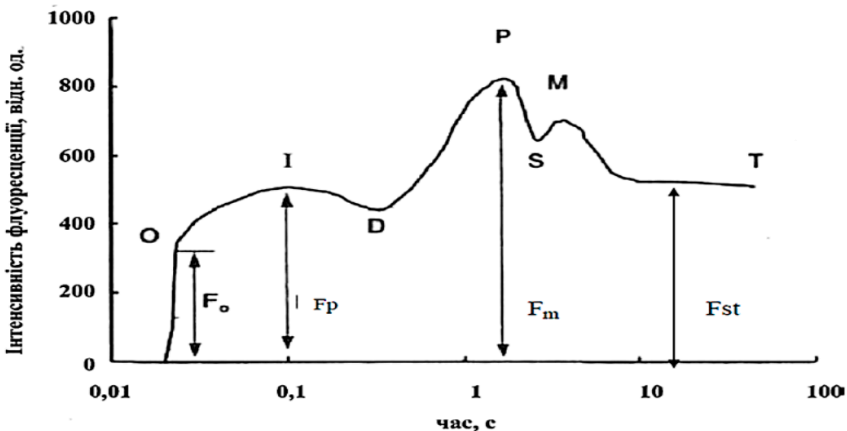


Рис. 1. Типова крива індукції флуоресценції хлорофілу (Крива Каутського) [14]

спектрофотометрі СФ-26, розраховуючи концентрацію пігментів за відповідними формулами [25].

Для статистичної обробки використовували програму MS Excel.

Результати. Певна динаміка змін була виявлена при аналізі функціональної активності фотосинтетичного апарату рослин козлятника (впродовж 4–14 діб), яку визначали за параметрами флуоресценції хлорофілу здорових й уражених фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп – *A. laidlawii* var. *granulatum* 118 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* Д13 (рис. 2). Оскільки на 4 добу після штучного зараження величини квантової ефективності фотохімії ФС II (F_v/F_m) (рис. 2 б) та максимуму флуоресценції (F_m) (рис. 2 в) були вищими за контрольний рівень, а фонові флуоресценція (F_0) – нижча (рис. 2 а), в цьому разі можна було б зробити висновок про активування фотосинтетичної активності листків. Проте стресовий вплив ураження віддзеркалювало суттєве зростання величини K_{pl} в листках інфікованих рослин, особливо при ураженні *P. syringae* pv. *atrofaciens* (рис. 3 а), яке свідчило про збільшення кількості Q_B – невідновлювальних комплексів, що не беруть участь у лінійному транспорті електронів на пул пластохінонів. Про негативний ефект ураження свідчило також скорочення $1/2t$ часу досягнення варіабельної флуоресценції (рис. 3 б), що віддзеркалює зменшення пулу акцепторів електронів за блокування транспорту електронів на пул пластохінонів. На 8 добу фонові флуоресценція додатково знижувалася в уражених фітопатогенами листках, квантова ж ефективність фотохімії ФС II інфікованих рослин була вище контролю за інфікування фітоплазмою та змішаного інфікування і продовжувала зростати за бактеріального інфікування *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Спадання максимуму флуоресценції у листках рослин козлятника в усіх варіантах ураження (рис. 2 в) може свідчити про утруднення ресинтезу хлорофілу в умовах інфекційного навантаження на рослини. Варто відмітити, що рівень показника F_m опосередковано характеризує

Таблиця 1

Характерні відрізки кривої ІФХ та їх діагностичне значення [15]

Відрізок кривої ІФХ	Вигляд (ознаки відрізка)	Інтервали часу, можливий (вірогідний)	Стадії фотосинтетичного процесу, інформацію про який дає цей відрізок
Точка О	Початковий відрізок	від 0 до 5 мс	Ефективність світлозбирання та реакційних центрів хлорофілу ФС II.
О-I-D-P	Вихід на головний максимум	від 0,1 до 10,0 с (від 0,1 до 1,0 с)	Електрон-транспортна ланка (від H_2O до Фд (фередоксин) і НАДФ) – так звана «світлова стадія» фотосинтезу.
P-S-M	Спадання та вихід на другий максимум	від 3,0 до 50,0 с від (0,5 до 10,0 с)	Активация (через Фд) білків-ферментів циклу Кальвіна, встановлення градієнта рН у мембранах, відновлення конкуруючих акцепторів (O_2 , NO_2 тощо).
M-T	Спадання й вихід на стаціонарний режим	Від 10,0 до 2000,0 Від (10,0 до 300,0 с)	Налагодження реакцій циклу Кальвіна й потоків речовин через мембрани та судинами листка.

величину ємності «антенного комплексу», що має здатність постачати поглинуту енергію на реакційні центри ФС II [26]. На цьому часовому інтервалі величина K_{pl} знижувалася, але величина $1/2t$ часу досягнення варіабельної флуоресценції зберігала свою тенденцію і була нижчою контрольного рівня. На 14 добу ураження картина почала змінюватися: намітилася тенденція до зростання фонові флуоресценції, особливо в умовах змішаного інфікування (рис. 2 а), пригнічувалася квантова ефективність фотохімії ФС II (рис. 2 б, в) й суттєво знижувався показник F_m , особливо в листках, уражених бактеріозом рослин (рис. 2 в). Величина $1/2t$ часу досягнення варіабельної флуоресценції сягала контрольного рівня (рис.3 б), проте показник K_{pl} суттєво зростає – у 8; 1,8 і 5,2 раза до контролю за ураження бактеріозом, фітоплазмозом і змішаною інфекцією відповідно (див. рис. 3 а).

Варто відмітити істотне пригнічення показника K_v в листках уражених рослин козлятника (на 14 добу), що віддзеркалює активність основного лімітуючого фермента циклу Кальвіна – рибулозобісфосфаткарбоксилази (РБФК) [15, 27, 28] (рис. 3 в). Отже, починаючи з 4-ї доби від початку ураження фітопатогенними мікроорганізмами, попри підвищення ефективності фотохімії ФС II, рівень якої зберігався до 8-ї доби, відмічали скорочення пулу акцепторів електронів за блокування транспорту електронів на пул пластохінонів, зростання кількості Q_B – невідновлювальних комплексів, що не беруть участь у лінійному транспорті електронів на пул пластохінонів, завдяки чому вже на 8 добу спостерігали утруднення ресинтезу хлорофілу. На 14 добу відбувалися вже більш помітні зміни

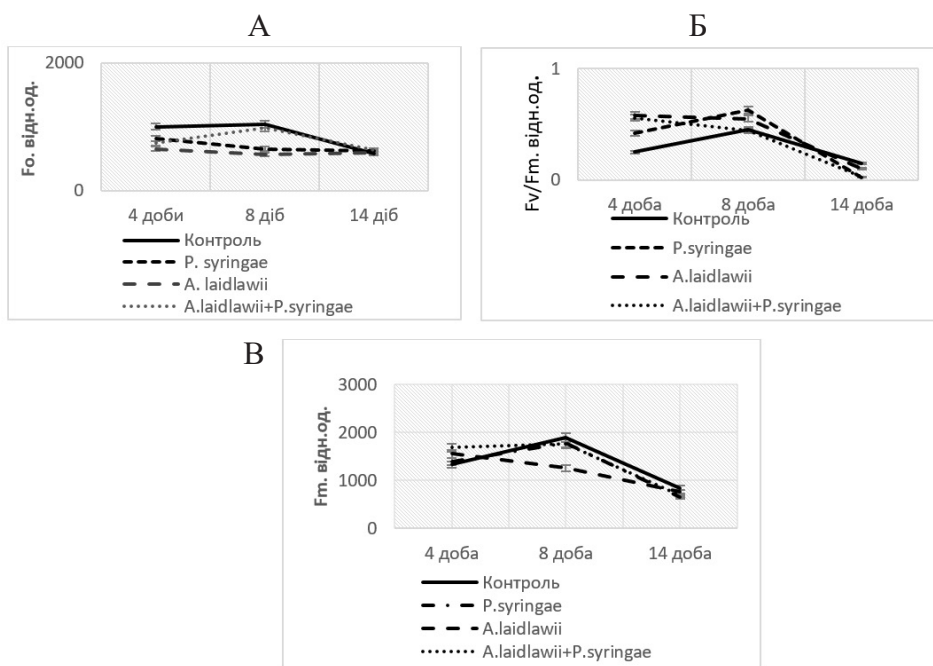


Рис. 2. Динаміка змін індукційних параметрів «світлової фази фотосинтезу» (фонові флуоресценції – F_0 , максимальної квантової ефективності ФС II – F_v/F_m , максимуму флуоресценції – F_m) фотосинтетичного апарату листків верхнього ярусу рослин *Galega orientalis L.*, штучно інфікованих фітопатогенами різних таксономічних груп

– тенденція до скорочення вмісту активного хлорофілу, блокування електронного транспорту, зниження ефективності фотохімії ФС II і пригнічення фіксації вуглецю.

Реакція фотосинтетичного апарату уражених фітопатогенними мікроорганізмами рослин люцерни на 4 добу мала подібну тенденцію – це підвищений рівень показників F_v/F_m і F_m та зниження F_0 (рис. 4 б, в, а).

Підвищений рівень перших двох показників скоріш за все мав компенсаторний ефект. Проте показник K_{pl} уражених бактеріозом і фітоплазмозом рослин люцерни навіть знижувався (рис. 5 а) на фоні скорочення $\frac{1}{2} t$ часу досягнення варіабельної флуоресценції (рис. 5 б), що свідчило про скорочення пулу акцепторів електронів.

На 8 добу фонова флуоресценція суттєво зростала в листках, уражених фітоплазмою та за змішаного інфікування (обом фітопатогенами) рослин, окрім варіанту із ураженням рослин збудником бактеріозу (рис. 4 а). При цьому рівень показників F_v/F_m та F_m був вищий за контрольний (рис. 4 б, в). Також суттєво зростала величина K_{pl} (рис. 5 а), а $\frac{1}{2} t$ навпаки знижувалась (рис. 5 б). На 14-ту добу продовжувала збільшуватися фонова флуоресценція уражених рослин люцерни на всіх дослідних варіантах (рис. 4 а), що свідчить про поступову деградацію пігмент-білкових комплексів ФС II

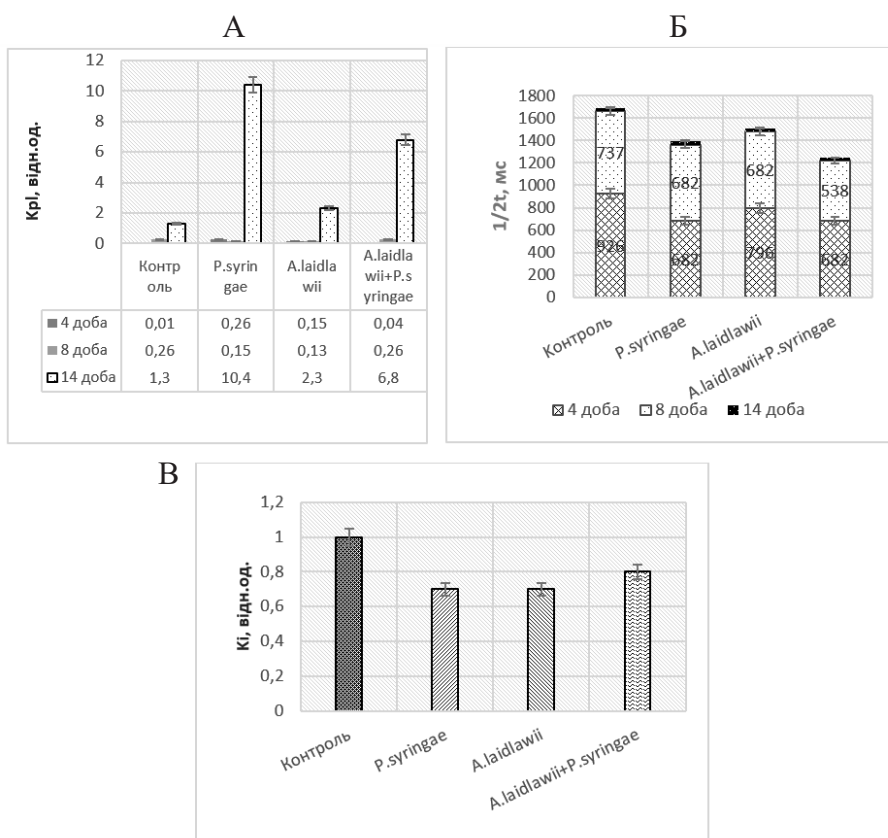


Рис. 3. Зміна окремих індукційних параметрів (а – коефіцієнт плато – K_{pl} , б – половина часу досягнення варіабельної флуоресценції – $\frac{1}{2} t$ (4–14 доба), в – індукційний коефіцієнт K_i (14 доба)) у фотосинтетичному апараті листків верхнього ярусу рослин *Galega orientalis L.*, штучно інфікованих фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп

та зниження вмісту хлорофілу.

При цьому показник F_v/F_m мав тенденцію до зростання на варіантах ураження фітоплазмою та зниження – за змішаної інфекції (рис. 4 б). Максимальна флуоресценція була більша за контроль на всіх варіантах ураження. Такий стан при ураженні фітопатогенами мікоплазмової і бактеріальної природи може свідчити про включення захисних регуляторних механізмів, долаючих стрес. Також варто відмітити суттєве зростання показника K_i (активності РБФК) через 14 діб в листках рослин, уражених збудниками бактеріозу і фітоплазмозу (рис. 5 в). Можливо, що таке зростання активності РБФК разом із скороченням антени СЗК ФС II й погіршенням квантової ефективності фотохімії ФС II за змішаного інфікування пов'язано із її оксигеназною активністю, а отже – зростанням фотодихання.

Визначивши вміст хлорофілу a і b та каротиноїдів у листках через 14 діб від початку інфікування, ми встановили зниження вмісту хл. a у всіх варіантах ураження рослин обох культур, тоді як вміст хл. b знижувався подібним чином лише в листках люцерни (табл. 2). В листках козлятника вміст хл. b знижувався лише за змішаного інфікування, тоді як при ураженні збудниками фітоплазмозу і бактеріозу його концентрація, навпаки, дещо зростала (табл. 2). Вміст каротиноїдів знижувався в уражених фітоплазмою листках люцерни та зростав за бактеріального та змішаного інфікування (табл. 2).

В листках козлятника спостерігали іншу тенденцію: концентрація каротиноїдів, що є захисними пігментами, зростала при ураженні збуд-

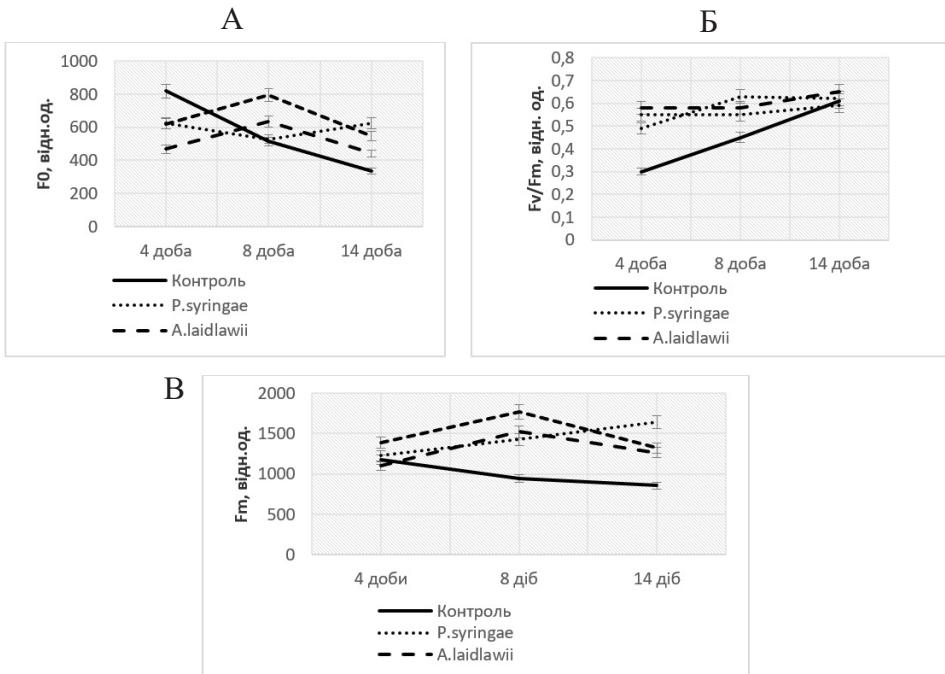


Рис. 4. Динаміка змін параметрів ІФХ (а – фонові флуоресценції – F_0 , б – максимальної квантової ефективності ФСII – F_v/F_m , в – максимуму флуоресценції – F_m) фотосинтетичного апарату листків верхнього ярусу рослин *Medicago L.*, штучно інфікованих фітопатогенами різних таксономічних груп

никами, як фітоплазму, так і бактерію, та знижувалася за змішаного інфікування (табл. 2).

Обговорення. Широкого розповсюдження у сучасній біології метод індукції флуоресценції хлорофілу як інформативного інструменту для експрес-діагностики набув завдяки можливості аналізу неінвазійних об'єктів у реальному вимірі часу та отриманню значного масиву даних, за якими можна робити висновки стосовно спрямованості змін фізіологічного стану рослини за дії як біотичних, так і абіотичних факторів [15–23, 29, 31, 32]. Метод ІФХ застосовувався і продовжує застосовуватися дослідниками для визначення впливу різних чинників: гербіцидів [15], біоморфологічних чинників [26], різних стресових факторів [31], температурного стресу [24], антропогенного забруднення [28, 30], фітопатогенних мікроорганізмів [27, 33–35] на рослинний організм крізь призму функціональної активності фотосинтетичного апарату. Теоретичним підґрунтям до такого застосування є визначений тісний зворотній зв'язок між інтенсивністю флуоресценції хлорофілу й фотосинтетичними реакціями [15–24, 29, 31].

Варто відмітити, що застосування методу індукції флуоресценції для визначення змін у фотосинтетичному апараті при зараженні фітопатогенними мікроорганізмами здатне віддзеркалювати глибину порушення

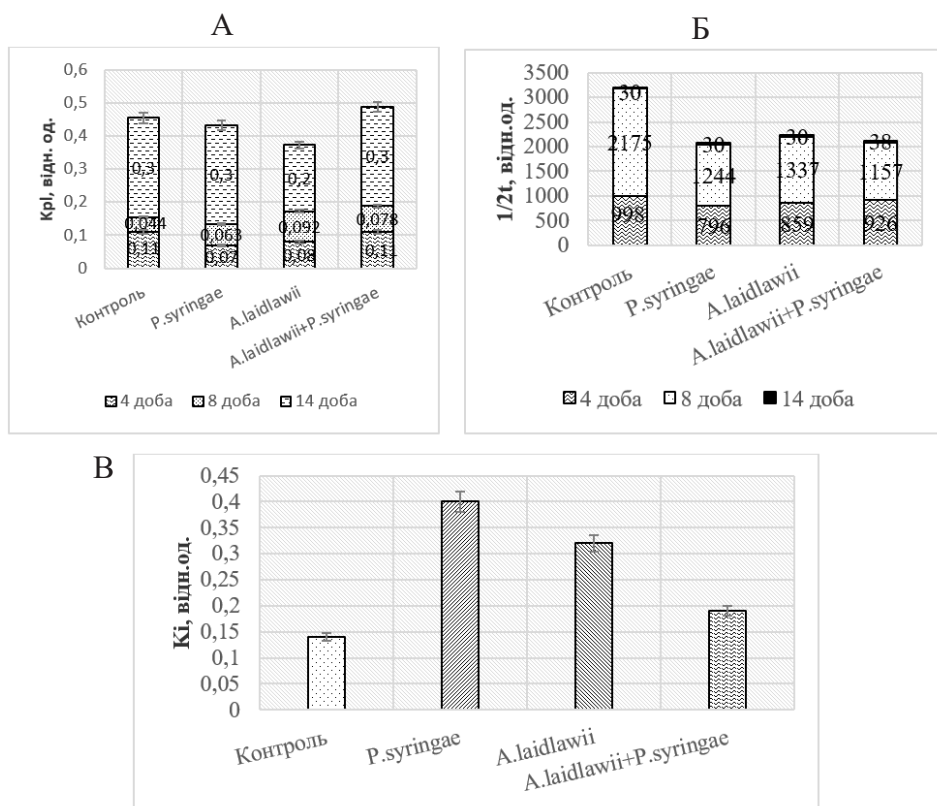


Рис. 5 Зміна окремих індукційних параметрів (а – коефіцієнт плато – K_p , б – половина часу досягнення варіабельної флуоресценції – $\frac{1}{2} t$ (4–14 доба), в – індукційний коефіцієнт K_1 (14 доба)) в листках верхнього ярусу рослин *Medicago L.*, штучно інфікованих фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп

метаболізму рослини-хазяїна, а також дає змогу порівняти фітопатогенні мікроорганізми за інтенсивністю впливу на заражену рослину та ефективність дії біологічно активних речовин на рослину вже на ранніх етапах розвитку хвороби.

Досліджуючи вплив вірусу смугастої мозаїки на показники індукованої флуоресценції хлорофілу та порівнюючи ці показники із даними імуноферментного аналізу, Чернюк із співавторами встановила існування зв'язку між концентрацією вірусу у клітинах рослин і величиною зміни показників параметрів індукованої флуоресценції [33]. В роботі Кирика та ін. методом ІФХ визначено зміни у фотосинтетичному апараті рослин чорної смородини, ураженої вірусом махровості, і малини, ураженої вірусом жовтої плямистості, і встановлено, порівняно із інтактними рослинами, зростання рівня флуоресценції на всьому часовому інтервалі індукційної кривої. Авторами також встановлено зростання показника K_{pl} , що перевищувало значення 0,5 і запропоновано використовувати таке перевищення як діагностичний параметр на наявність вірусної інфекції [27]. У нашій попередній роботі ми визначали вплив штучного інфікування *A. laidlawii* на активність фотосинтетичного апарату 7–15 добових рослин пшениці озимої і встановили суттєве зростання коефіцієнта K_{pl} в листках заражених рослин на п'ятнадцяту добу, який становив 0,54 [33]. У іншій нашій роботі, де досліджувався вплив штучного інфікування *P. syringae* pv. *atrofaciens* чотирма штамми різного походження рослин пшениці у фазу трубкування, визначений зв'язок між агресивністю цих штамів за візуальними ознаками і змінами флуоресцентних параметрів та динамікою негативного впливу зараження ними на фотосинтетичний апарат [34].

Таблиця 2

Вміст пігментів в листках *Medicago L.* і *Galega orientalis L.* через 14 діб від початку штучного інфікування фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп (польовий дослід)

Варіанти	Пігменти, мг/г сирової речовини			
	хл. <i>a</i>	хл. <i>b</i>	хл. (<i>a+b</i>)	каротиноїди
<i>Medicago L.</i>				
Контроль	2,91±0,14	1,43±0,07	4,34±0,21	0,71±0,035
<i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i>	1,93±0,09	1,36±0,06	3,29±0,16	0,51±0,025
<i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i> + <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	1,66±0,08	1,34±0,06	3,00±0,35	0,87±0,04
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	1,41±0,07	0,95±0,04	2,36±0,11	0,82±0,04
<i>Galega orientalis L.</i>				
Контроль	1,44±0,07	0,87±0,04	2,31±0,11	0,51±0,025
<i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i>	1,39±0,06	0,94±0,04	2,31±0,11	0,76±0,038
<i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i> + <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>)	1,22±0,06	0,73±0,03	1,95±0,09	0,53±0,026
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>)	1,26±0,06	1,09±0,05	2,35±0,11	0,73±0,036

Зважаючи на отримані нами дані перевищення величини K_{pl} через 14 діб для листків козлятника, штучно інфікованих фітопатогенними бактеріями і мікоплазмами, а особливо за інфікування *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, можна розширити діагностичне використання величини коефіцієнта K_{pl} до більш широкої вибірки фітопатогенних мікроорганізмів, зокрема, мікоплазмової і бактеріальної природи.

Узагальнюючи отримані нами дані, варто відзначити, що при штучному інфікуванні рослин бобових культур – люцерни і козлятника фітопатогенними мікроорганізмами різних таксономічних груп – *P. syringae* pv. *atrofaciens* і *A. laidlawii* var. *granulum* – нами встановлені ранні функціональні зміни у світловій фазі фотосинтезу листків рослини-хазяїна вже на 4 добу від початку інфікування ще до появи візуальних проявів інфікування: скорочення пулу акцепторів електронів (за показником половини часу досягнення варіабельної флуоресценції – $1/2t$). Подібний вплив на цей показник спостерігали за дії похідних сечовини (моноурону й діурону) гербіцидів на основі симетричного триазину (атразину та тіотриазину), механізм дії яких полягає у блокуванні транспорту електронів з ФС II та на пул пластохінонів, в результаті чого збільшується швидкість відновлення первинного акцептору ФС II – Q_A , а отже – і швидкість зростання варіабельної флуоресценції при відповідному зменшенні часу [15]. Про більшу чутливість рослин козлятника 1-го року вирощування до ураження фітопатогенними мікроорганізмами, особливо до дії бактеріального і змішаного інфікування, свідчило збільшення на 4 добу величини K_{pl} , тобто кількості Q_B – невідновлювальних комплексів, що не беруть участі у лінійному транспорті електронів на пул пластохінонів. Тоді як про більшу стійкість фотосинтетичного апарату листків люцерни свідчило більш пізнє зростання величин K_{pl} – на 8 добу при ураженні фітоплазмою та змішаному інфікуванні.

Підтвердженням поглиблення патологічного процесу у штучно інфікованих рослинах стала фіксація як типових, так і нетипових візуальних симптомів на 14 добу від зараження. В той час як у фотосинтетичному апараті листків обох рослин відмічалися найбільш помітні зміни, як у «світловій», так і «темновій» фазах фотосинтезу. Такі зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату відповідали змінам пігментного складу листків обох культур, найбільш суттєво – хлорофілу *a*, що є основним складником ФС II. Варто відмітити, що за ступенем негативної дії на вміст хлорофілу *a* в листках обох рослин досліджувані фітопатогени можна розташувати у послідовності: *P. syringae* pv. *atrofaciens* + *A. laidlawii* var. *granulum* (змішане інфікування) > *P. syringae* pv. *atrofaciens* > *A. laidlawii* var. *granulum*.

Можна передбачити, що більш деструктивний вплив бактеріальних збудників пов'язаний із продукуванням токсинів, які можуть призводити до збільшення ступеню ураження та істотно підвищувати вірулентність продукуючих їх патогенних мікроорганізмів, оскільки вважається, що деякі фітотоксини можуть змінювати метаболічні процеси в організмі хазяїна, виявляючи згубну дію, переважно на біохімічному рівні [35].

Отже, метод індукції флуоресценції хлорофілу є досить чутливим й віддзеркалює наслідки впливу фітопатогенних мікроорганізмів на рослину та їх інтенсивність. За допомогою цього методу до візуального прояву

уражень можна фіксувати як ранні негативні зміни у фотосинтетичному апараті рослин за дії фітопатогенних мікроорганізмів, так і порівнювати рослини за чутливістю до різних фітопатогенів.

Таким чином, інфікування рослин бобових культур фітопатогенами різних таксономічних груп призводить до зниження ефективності акумулювання енергії квантів світла фотосинтетичним апаратом листків, що на ранніх стадіях (чотири дні від початку інокуляції) відбувається за рахунок скорочення пулу акцепторів електронів. За дії штучного інфікування фітопатогенними мікроорганізмами рослин козлятника і люцерни відмічалися поступові структурно-функціональні зміни у фотосинтетичному апараті рослини-хазяїна, що призводили до погіршення фотосинтетичної активності листків. Такі функціональні зміни у активності фотосинтетичного апарату є одним із наслідків дії фітопатогенних мікроорганізмів на рослинний метаболізм. Виявлено порівняно вищу чутливість рослин козлятника 1-го року вирощування до досліджуваних фітопатогенів. За ступенем деструктивної дії на вміст хлорофілу *a* бобових рослин 1-го року вирощування – *Galega orientalis* L. і *Medicago* L. – фітопатогенні мікроорганізми можна розташувати у наступній послідовності: *P. syringae* pv. *atrofaciens* + *A. laidlawii* var. *granulum* (змішане інфікування) > *P. syringae* pv. *atrofaciens* > *A. laidlawii* var. *granulum*.

ИЗМЕНЕНИЯ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ АППАРАТЕ БОБОВЫХ КУЛЬТУР, ПОРАЖЕННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ БАКТЕРИОЗОВ И ФИТОПЛАЗМОЗОВ

Гуляева А.Б., Токовенко И.П., Пасичник Л.А., Щербина Т.Н.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель. Исследование динамики изменений в фотосинтетическом аппарате листьев при воздействии искусственного заражения растений бобовых культур *Galega orientalis* L. и *Medicago* L. фитопатогенными микроорганизмами различных таксономических групп: возбудителем бактериоза – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Д13 и возбудителем фитоплазмоза – *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. **Методы.** Культивирование бактерий и микоплазм, а также приготовление бактериальной и микоплазменной суспензии выполняли, используя общепринятые методики, искусственную инокуляцию растений полученными суспензиями осуществляли методом субъэпидермальной инъекции. Фотохимическую активность листьев определяли методом индукции флуоресценции хлорофилла, а спектрометрией – концентрацию фотосинтетических пигментов. Для статистической обработки использовали программу MS Excel. **Результаты.** Обобщены данные о влиянии фитопатогенных микроорганизмов различных таксономических групп: *P. syringae* pv. *atrofaciens* Д13 и *A. laidlawii* var. *granulum* 118 на состояние и активность фотосинтетического аппарата растений *Galega orientalis* L. и *Medicago* L. Установлено, что еще до появления визуальных признаков инфицирования – на 4 сутки от начала – происходит угнетение эффективности световой фазы фотосинтеза в связи с сокращением пула акцепторов электронов в электрон-транспортной цепи ФСII фотосинтетического аппарата

листьев растения-хозяина, которое через 14 суток приводит к существенным фотофизическим изменениям и угнетению эффективности фотосинтеза в листьях. Обнаруженные фотофизические изменения отражали снижение содержания хлорофилла *a* во всех вариантах поражения. **Выводы.** Искусственное заражение растений бобовых культур фитопатогенами различных таксономических групп приводит к снижению эффективности аккумуляции энергии квантов света фотосинтетическим аппаратом листьев на ранних стадиях, что происходит за счет сокращения пула акцепторов электронов. На более поздних стадиях патологический процесс углубляется, что ухудшает фотосинтетическую активность листьев. Выявлена высокая чувствительность бобовых растений к смешанной и бактериальной инфекции и сравнительно высокая чувствительность растений козлятника 1-го года выращивания к исследуемым фитопатогенам.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum*, *Medicago L.*, *Galega orientalis L.*, фотосинтетический аппарат, индукция флуоресценции хлорофилла, хлорофилл *a* и *b*, каротиноиды.

CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF LEGUMEN CROPS UNDER DAMAGE BY INFECTANT OF BACTERIOSIS AND PHYTOPLASMOSIS

Huliaieva H.B., Tokovenko I.P., Pasichnyk L.A., Shcherbyna T.M.

*Institute of Microbiology and Virology NASU, Acad. Zabolotny str.154,
Kyiv, 03143, Ukraine*

Purpose. Investigations of the dynamics of changes in the photosynthetic apparatus of leaves under the influence of artificial infection of leguminous plants *Galega orientalis L.* and *Medicago L.* with phytopathogenic microorganisms of various taxonomic groups: the causative agent of bacteriosis – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* D13 and the causative agent of phytoplasmosis – *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118. **Methods.** The cultivation of bacteria and mycoplasmas, as well as the preparation of bacterial and mycoplasmal suspension, were carried out using conventional methods, artificial plant inoculation with the obtained suspensions have been performed by subepidermal injection. Photochemical activity of the leaves was determined with the method of chlorophyll *a* fluorescence induction, and spectrometry have been applied for the concentration of photosynthetic pigments determination. For statistical measure, MS Excel was used. **Results.** Data on the effect of phytopathogenic microorganisms of various taxonomic groups are summarized: *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13 and *A. laidlawii* var. *granulum* 118 on the state and activity of the photosynthetic apparatus of plants *Galega orientalis L.* and *Medicago L.* It has been established that even before the appearance of visual signs – on the 4th day after beginning infection, have been observed decrease of the efficiency of light-phase of photosynthesis, which have been occurred due to a reduction of the electron acceptor pool in electron transport chain PSII photosynthetic apparatus of leaves of the host plant, that after 14 days have been lead to significant photophysical changes and inhibition of the photosynthetic efficiency in the leaves. The detected photophysical changes reflected a decrease in the chlorophyll *a* content at infection by phytopathogens in all variants. **Conclusions.** Artificial infection of leguminous plants with phytopathogens of different taxonomic groups leads to a decrease in the efficiency of accumulation of the energy of

the light quanta by photosynthetic apparatus of leaves in the early stages, which is due to the reduction of the electron acceptor pool. At later stages, the pathological process deepens, which worsens the photosynthetic activity of the leaves. The greater sensitivity of leguminous plants to mixed and bacterial infection was revealed, and the sensitivity of the plants *Galega orientalis* L. of the first year of cultivation to the investigated phytopathogens was relatively high.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118, *Medicago* L., *Galega orientalis* L., photosynthetic apparatus, chlorophyll *a* fluorescence induction, chlorophyll *a* and *b*, carotenoids.

1. Antonets SS. Syderalni kultury: prakt. rek. In: Pysarenko VM, editor. Poltava: Simon; 2011. 52 s. Ukrainian.
2. Adamovics A, Dubrovskis V, Plume I. Galega for fodder and biogas production. In: 13th International Conference of Forage Conservation 2008; Sep 3–5; Nitra, Slovakia. P.170–171. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143176638>.
3. Baležentienė L, Spruogis V. Experience of fodder galega (*galega orientalis* lam.) and traditional fodder grasses use for forage production in organic farm. Veterinarija ir zootechnika (*Vet Med Zoot*). 2011; 56 (78): 19–26.
4. Patyka VP, Pasichnyk LA, Zhytkevych NV, Hulciaieva HB, Tokovenko IP, Hnatiuk TT ta in. Khvoroby kozliatnyka skhidnoho: monitorynh, diahnostryka, profilaktyka: Metodychni rekomendatsii. In: Patyka VP, Petrychenko VF editors. Vinnytsia: «Vindruk». 2016; 48 s. Ukrainian.
6. Hvozdiak RI, Pasichnyk LA, Yakovleva LM, Moroz SM, Lytvynchuk O.O. Zhytkevych N.V. Fitopatohenni bakterii, bakterialni khvoroby roslyn: monohrafiia. In: Patyka VP, editor. K.: TOV «NVP «Interservis». 2011; 444 s. Ukrainian.
7. Patyka VP, Pasichnyk LA. [Phytopathogenic bacteria in the system of modern agriculture]. Mikrobiol Z. 2014;76 (1): 21–26. Ukrainian.
8. Cwalina-Ambroziak B, Koc J. Fungi colonising the aboveground parts of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.) cultivated in pure sowing and mixed with smooth brome-grass (*Bromus inermis* Leyss.) Acta Agrobotanica. 2012; 58(1):125–133 DOI 10.5586/aa.2005.018
9. Popkova KV, Shkalikov VA, Stroykov YuM, Lekomtseva SN, Skvortsova IN Obschaya fitopatologiya: uchebnik dlya vuzov. 2-e izd. M.: Drofa. 2005; 445 s. Russian
10. Skripal IG, Tokovenko IP, Malynovska LP. [Extracellular fructosobisphosphatase of the agent of pale-green dwarfness of cereals: molecular-biological and serological properties]. Mikrobiol Z. 2004; 66 (3): 89–97. Ukrainian.
11. Gulyaev BI. [Photosynthetic of agroecosystems productivity. Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 2003; 35(5):371–381. Russian.
12. Patyka VP, Pasichnyk LA, Dankevych LA, Moroz SM, Butsenko L.M. Zhytkevych N.V. Diahnostryka fitopatohennykh bakterii. Metodychni rekomendatsii. In: Patyka VP, editor. K. 2014; 76 s. Ukrainian.
13. Skripal IG, Malynovskaya LP. Sreda SM IMV-72 dlya vydeleniya i kultivirovaniya fitopatogennykh mikoplazm. Mikrobiol Z. 1984; 46 (2):71–75] Russian.
14. Portatyvnyi fluorometr «Florotest»: nastanova z ekspluatatsii. Instytut Kibernetyky im. VM Hlushkova NAN Ukrainy. 2013; 24 s. Ukrainian.
15. Braion OV, Kornieiev DYu., Sniehur OO, Kytaiev OI. Instrumentalne vyvchennia foto-

- syntetychnoho aparatu za dopomohoiu induktsii fluorestsentsii khlorofilu: Metodychni vkazivky dlia studentiv biolohichnoho fakultetu. K.: Vydavnycho-polihrafichnyi tsentr «Kyivskiy universytet». 2000; 15 s. Russian.
16. *Henriques FS*. Leaf Chlorophyll Fluorescence: Background and Fundamentals for Plant Biologists. *Bot. Rev.* 2009; 75: 249–270.
 17. *Horton P, Ruban A, Walters RG*. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 1994;106 (2): 415–420.
 18. *Korneev D*. Informatsionnye vozmozhnosti metoda induktsii fluorestsentsii hlorofilla. Kyiv: Alterpress. 2002; 191 s. Russian. http://www.oocities.org/photosynthesis_kiev/Korneyev_book.pdf.
 19. *Misra AN, Misra M, Singh R*. Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology, Biophysics. In: Misra AN, editor. 2012; 7: 171–192. <http://www.intechopen.com/books/biophysics/chlorophyll-fluorescence-in-plant-biology>
 20. *Schreiber U, Bilger W, Neubauer C*. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of photosynthesis*. Schulze ED, Caldwell MM, editors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1994; 100, p. 49–70.
 21. *Stirbet A, Govindjee*. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. and Photobiol.* In: *Biology*. 2011;104 (1–2): 236–257. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.
 22. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. In: Papageorgiou GC, Govindjee, editors. Springer, Netherlands. 2004; 793 p. <http://www.springer.com/gp/book/9781402032172#>
 23. *Stirbet A, Govindjee*. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynth Res*; 2012; 113: 15–61. DOI: 10.1007/s11120-012-9754-5.
 24. *Ribeiro RV, Santos MG, Machado ES, Oliveira RF*. [Leaf photochemical reaction beans to heat stress after prior water deficit]. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008; 55(3):387–369 Russian. <http://naukarus.com/fotohimicheskaya-reaktsiya-listiev-fasolina-teplovoy-stress-posle-predvaritelnogo-vodnogo-defitsita>
 25. *Hisox JD, Israelstam RJ*. The method for the extraction of chlorofill from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 1979; 57(12): 1332–1334.
 26. *Ivashchenko YV*. [Some biomorphological peculiarities of peach varieties, which determine their photosynthesis productivity]. *Chornomorski Botanical Journal*. 2012; 8 (4): 370–378. Russian.
 27. *Kyryk MM, Taranukho IuM, Taranukho MP, Kytaiiev OI, Skriaha VA, Artemenko DM*. Diahnostyka virusnoi infektsii smorodyny chornoj ta malyny metodom induktsii fluorestsentsii khlorofilu lystkiv. *Visnyk aharnoi nauky*. 2011; (10): 26–28. Ukrainian.
 28. *Olekseichenko N, Kitaev O, Sovakova O, Sovakov O, Borhshevskiy M*. [Features of the induction of chlorophyll fluorescence in leaves of woody plants in urban environment]. *Biological Resources and Nature Management*. 2013; 5 (5–6): 107–112. Ukrainian. http://irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=PDF/bpc_2013_5_5-6_14.pdf

29. Fromme P, Kern J, Loll B, Biesiadka J, Saenger W, Witt HT, Krauss N, Zouni A. Functional implications on the mechanism of the function of photosystem II including water oxidation based on the structure of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002; 357(1426): 1337–1344.
30. Žurek G, Rybka K, Pogrzeba M, Krzyżak J, Prokopiuk K. Chlorophyll a Fluorescence in Evaluation of the Effect of Heavy Metal Soil Contamination on Perennial Grasses. *PLoS One.* 2014; 9(3): e91475. DOI: 10.1371/journal.pone.0091475.
31. Goltsev VN, Kaladzhi HM, Paunov M, Baba B, Horachek T, Moyski Ya, Kotsel H, Allahverdiyev SI. [The use of variable chlorophyll fluorescence to evaluate the physiological state of the photosynthetic apparatus of plants]. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2016; 63 (6): 881–907. Russian. <http://www.rusplant.ru/index.php?page=Posts.ViewPost&id=1030&PHPSESSID=lcowrsvifjo>
32. Bukhov NH. [Mekhanyzmy i funktsyy alternatyvnykh putei perenosa elektronov v khloroplaste, svyazannyye s FS 1]. *Fyziolohyia rastenyi.* 2006. 53(5): 645–657. Russian.
33. Chernyuk SO, Boyko AL, Korneev DIu, Mamenko PM. Vpliv virusu smugastoyi mozayiki pshenitsi na parametri indukovanoyi flyuorestsentsiyi roslin *Triticum aestivum*. *Biopolimeryi i kletka.* 1999. 15(5): 445–448. Ukrainian.
34. Gulaeva AB, Tokovenko IP, Patyka VP. [Change in the photosynthetic apparatus winter wheat under the influence of *Acholeplasma Laidlawii* st. 118.] *Naukovi zapysky Ternopilskoho natsionalnoho pedahohichnoho universytetu im. Volodymyra Hnatiuka. Ser. «Biol».* 2015; 62(1): 77–83. Ukrainian.
35. Gulyaeva AB, Pasichnyk LA, Patyka VP. Funktsionalna aktyvnist fotosyntetychnoho aparatu pshenytsi yaroi za shtuchnoho zarazhennia shtamamy *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* riznoho pokhodzhennia. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Serii: Biol,* 2016. 2 (38): 84–93. Ukrainian.
36. Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63(2): 266–292.

Отримано 10.02.2017